

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Lucija Kučko

UTJECAJ pH NA EKSTRAKTIBILNOST PROTEINA I PEPTIDA IZ BRAŠNA
JEČMA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Biokemija
Tema rada je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 20.6.2013.
Mentor: *izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec*
Pomoć pri izradi: *Tihomir Kovač, mag. ing., asistent*

UTJECAJ pH NA EKSTRAKTIBILNOST PROTEINA I PEPTIDA IZ BRAŠNA JEČMA

Lucija Kučko, 136/DI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu ekstrahiranih proteina i peptida te slobodnih amino skupina iz cjelovitog brašna ječma šest različitih sorti ječma. Za ekstrakciju je korišten Britton-Robinsonov pufer raspona pH vrijednosti od 3 do 11. Rezultati su pokazali značajan utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu ekstrahiranih proteina iz cjelovitog brašna ječma. Naime, povišenjem pH ekstrakcijskog otapala u rasponu od 3-11 ustanovljen je četverostruki porast količine ekstrahiranih proteina. Rezultati su pokazali da pH pufera utječe i na količinu ekstrahiranih slobodnih amino skupina. Analiza TCA supernatanta pokazala je da mali peptidi čine prosječno 4% od ukupne količine proteina, ali da doprinose 60-80% ukupnoj količini detektiranih slobodnih amino skupina. SDS-PAGE analiza ekstrakata potvrdila je značajan utjecaj pH na količinu ekstrahiranih proteina, no isto tako pokazala da se proteini ekstrahirani Britton-Robinsonovim puferom mogu prije svega pripisati albuminima i globulinima ječma.

Ključne riječi: ječam, pH ekstrakcijskog otapala, peptidi, proteini, slobodne amino skupine, SDS-PAGE

Rad sadrži: 36 stranica
18 slika
3 tablice
0 priloga
24 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Maja Molnar</i> | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 4. lipnja 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Sub-department of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Biochemistry

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. IX. held on June 20, 2013.

Mentor: *Ivica Strelec*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Tihomir Kovač*, M. Eng, assistant

pH DEPENDENCE OF BARLEY FLOUR PROTEIN AND PEPTIDE EXTRACTABILITY

Lucija Kučko, 136/DI

Summary: The aim of this study was to determine pH dependence on protein, peptide and free amino groups extractability from wholemeal barley flour of six barley varieties. Extracts were prepared using Britton-Robinson buffer of various pH values, ranging from 3 to 11. Results showed a significant pH dependence on protein extractability. Increase of extraction pH from 3 to 11 resulted with fourfold increase in protein content. pH dependence on free amino groups extractability was also observed. Analysis of corresponding TCA supernatants showed that small peptides contribute about 4% to total protein content, but 60 to 80 % to the free amino group content. SDS-PAGE of proteins confirmed pH dependence of protein extractability. Moreover, it showed that albumins and globulins are the major proteins present in extracts prepared by Britton-Robinson buffers of various pH's.

Key words: barley, extraction pH, free amino groups, peptides, proteins, SDS-PAGE

Thesis contains: 36 pages
18 figures
3 tables
0 supplements
24 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Maja Molnar</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: June 4, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

„Korjeni učenja su gorki, ali plodovi slatki.“

Aristotel

Hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Strelecu koji je uvijek spreman pomoći i prenijeti svoje veliko znanje. Bila mi je čast biti njegovim studentom. Hvala i dragoj tehničarki Dragici Roknić s kojom je bio užitak surađivati te mag. ing. techn. aliment. Tihomiru Kovaču na pomoći tijekom izrade ovog rada.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima, Ružici i Rudolfu, koji su mi prvenstveno omogućili da studiram, a zatim zajedno s bratom Lavoslavom i bakom Pepicom bili pri ruci kad god je zatrebalo. Od srca vam hvala na svim molitvama i podršci.

Hvala i mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali ove studentske dane i s kojima je sve bilo lakše.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KEMIJSKI SASTAV ZRNA JEČMA	4
2.2. PROTEINI JEČMA.....	5
2.3. TOPLJIVOST PROTEINA	8
2.3.1. Ovisnost topljivosti o pH	9
2.3.2. Ovisnost topljivosti o koncentraciji soli	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. ZADATAK	12
3.2. UZORCI I KEMIČALIJE	12
3.3. PRIPREMA UZORAKA.....	12
3.4. EKSTRAKCIJA PROTEINA I PEPTIDA	12
3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA.....	13
3.6. ODREĐIVANJE SLOBODNIH AMINO SKUPINA	14
3.7. SDS-PAGE	15
3.8. STATISTIČKA ANALIZA	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. UTJECAJ pH NA KOLIČINU EKSTARHIRANIH PROTEINA I PEPTIDA	17
4.2. UTJECAJ pH NA KOLIČINU SLOBODNIH AMINO SKUPINA.....	22
4.3. ELEKTROFORETSKI PROFIL PROTEINA JEČMA U OVISNOSTI O pH	28
5. ZAKLJUČCI	32
6. LITERATURA	34

1. UVOD

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice trava. Koristi se pretežno kao stočna hrana, a u posljednje vrijeme povećana je upotreba ječma i u ljudskoj prehrani. Sadržaj proteina u zrnu ječma je nizak i iznosi svega 8 – 15%, a između svih funkcionalnih svojstava proteina od najveće važnosti je topljivost zbog svog utjecaja na ostala svojstva kao što su stabiliziranje emulzija i stvaranje pjene (Kinsella, 1976.; Vojdani, 1996.). Obično je to i prvo svojstvo koje se određuje prilikom razvoja i testiranja proteina (Zayas, 1997.). Opće je poznato da na topljivost čistog proteina veliki utjecaj ima pH otopine te koncentracija soli (Strelec, 2009.). Međutim, kako pH utječe na topljivost složenog sustava sastavljenog od brojnih proteina poput proteina ekstrahiranih iz zrna ječma ili drugih žitarica nije potpuno istraženo.

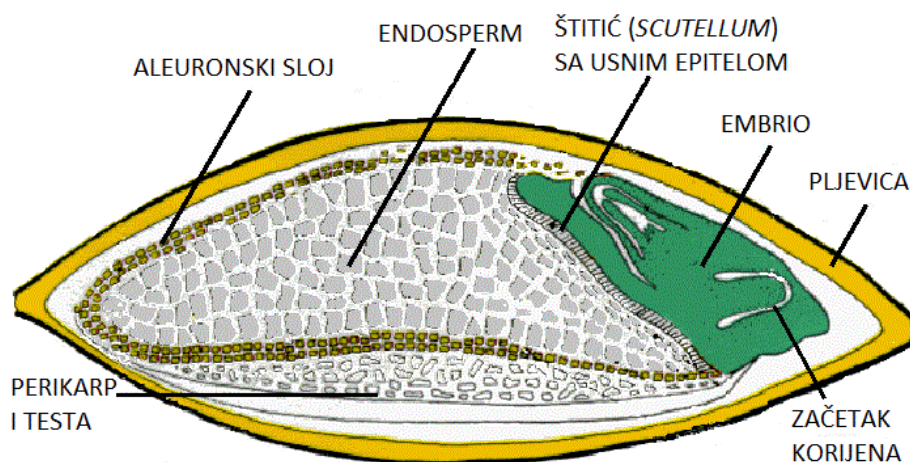
Upravo je cilj ovog istraživanja bio ispitati utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu ekstrahiranih proteina kao i slobodnih amino skupina iz cjelovitog brašna ječma šest različitih sorti. Dodatno je topljivost proteina ječma ovisno o primijenjenom pH ispitana pomoću SDS-PAGE.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJSKI SASTAV ZRNA JEČMA

Ječam pripada rodu *Hordeum* L. iz porodice trava *Poaceae* (*Gramineae* ili prave trave) koja obuhvaća oko 350 različitih vrsta, a sam rod *Hordeum* sadrži ih 32 (Australian Government, 2008.). Prema podacima USDA, NRSC Plant Database 11 je kultiviranih vrsta ječma. Najrasprostranjenija je *Hordeum vulgare* L. koja se intenzivno uzgaja kao stočna hrana. U posljednjih nekoliko godina povećana je upotreba ječma i u ljudskoj prehrani s obzirom da je poznato da sadrži povećanu koncentraciju β -glukana koji pozitivno djeluje na sniženje kolesterola (Newman i sur., 1989.), te regulira razinu glukoze u krvi (Cavallero i sur., 2002.).

Zrno ječma (**Slika 1**) sastoji se od embrija i endosperma koji su obavijeni aleuronskim slojem i zaštitnim ovojnicama (pljevicom, perikarpom i testom). Zaštitne ovojnice predstavljaju fizičku barijeru koja dijeli unutrašnjost zrna od vanjske okoline te tako sprječavaju kontaminaciju zrna mikrobnim i kemijskim agensima te reguliraju izlaz hranjivih tvari i vode iz zrna (USDA, 2004.).



Slika 1 Uzdužni presjek zrna ječma (<http://www.crc.dk/flab/the.htm>)

Količina pojedinih sastojaka zrna ječma varira ovisno o sorti, genotipu te primijenjenim agro-ekološkim mjerama, no unatoč tome, sastav je više-manje konstantan (**Tablica 1**). Glavni sastojak čine ugljikohidrati i to oko 80%. Zrno sadrži malu količinu proteina (8 – 15%) te nizak udio lipida i mineralnih tvari. Udio vode kreće se od 12 do 15% (USDA, 2004.).

Tablica 1 Kemijski sastav suhe tvari zrna ječma (USDA, 2004.)

Sastojak suhe tvari zrna ječma	Prosječni sastav/ % na suhu tvar zrna
UKUPNI UGLJIKOHIDRATI	78 – 83
Škrob	51 – 67
Saharoza	1 – 2
Ostali monosaharidi	1 – 2
Arabinoksilani	4 – 8
β-glukani	2,5 – 6,0
Celuloza	2 – 5
UKUPNI PROTEINI	8 – 15
Albumini i globulini	1 – 4
Hordeini	3 – 6
Glutelini	3 – 6
Aminokiseline i peptidi	0,5
UKUPNI LIPIDI	2 – 3
Trigliceridi	0,5 – 1,3
Fosfo- i glikolipidi	0,5 – 1,3
Voskovi i steroli	0,1 – 0,2
MINERALNE TVARI	1,9 – 2,5

2.2. PROTEINI JEČMA

Iako zrno ječma sadrži malu količinu proteina u usporedbi s ugljikohidratima, svega 8 – 15%, njihova količina i sastav imaju velik utjecaj na industrijsku namjenu ječma (Shewry, 1993.). Prema Osbornu (1895.) (**Tablica 2**) možemo ih klasificirati u četiri grupe na osnovi njihove topljivosti:

1. albumini (topljivi u vodi),
2. globulini (topljivi u otopinama soli),
3. prolamini (topljivi u vodeno-alkoholnom mediju) te
4. glutelini (topljivi u razblaženim otopinama kiselina ili lužina).

Albumini čine 10 – 12% ukupnih proteina zrna. S obzirom na svoju funkciju pripadaju metaboličkim i zaštitnim proteinima. Glavninu albuminske frakcije čine enzimi, dok ostatak otpada na ostale metaboličke proteine te inhibitore enzima. Prvenstveno su lokalizirani u

živim dijelovima zrna (embrij, aleuronski sloj), a manji dio se nalazi raspršen u mrtvim stanicama endosperma (Lásztity, 1999.). Molekularna masa im varira između 10 000 i 70 000, iako većinu čine niskomolekularni proteini. Albuminska frakcija sadrži visok udio glutaminske kiseline (+ glutamin), asparaginske kiseline (+ asparagin), glicina i alanina (Preston i Kruger, 1986.).

Globulini čine 2 – 18% ukupnih proteina zrna (Lásztity, 1999.). Glavninu čine skladišni proteini, a manji dio pripada perifernim membranskim proteinima ili su enzimi. Skladišni tip globulina pohranjen je u obliku proteinskog matriksa (7S i 11S globulini) i proteinskih kristaloida (11S globulini) unutar proteinskih skladišnih vakuola (PSV) embrija, štitića i aleuronskog sloja (Müntzi sur., 2001.). Molekularna masa im varira između 25 000 i 70 000. Prema aminokiselinskom sastavu ova je frakcija slična albuminskoj frakciji, s time da posjeduje znatno veći udio arginina, a niži udio asparaginske kiseline (+ asparagina) u odnosu na albuminsku frakciju (Preston i Kruger, 1986.).

Hordeini (prolamini) čine 35 – 55% ukupnih proteina zrna (Melzer i Kleihofs, 1987.). Prema funkciji spadaju u prave skladišne proteine. Mjesta skladištenja su im proteinska tijela mrtvih stanica endosperma unutar kojih tvore proteinski matriks sa čvrsto uklopljenim škrobnim zrnima (Preston i Kruger, 1986.). Iako su hordeini topljivi u vodeno-alkoholnom mediju, novija istraživanja pokazuju da jedan dio ovih proteina nije topljiv u nativnom stanju. Ovi polimerni proteini sadrže međumolekularne disulfidne mostove, redukcijom kojih nastaju polipeptidi topljivi u vodeno-alkoholnom mediju. Molekulska masa hordeina varira između 10 000 i 100 000 (Shewry i Halford, 2002.). Sadrže visok udio prolina i glutaminske kiseline uglavnom u obliku glutamina, a karakterizira ih i nizak udio bazičnih aminokiselina (Preston i Kruger, 1986.).

Glutelini čine 30 – 40% ukupnih proteina zrna ječma. Prema svojoj funkciji su metabolički i skladišni proteini. Obzirom na aminokiselini sastav nalaze se između prolamina i globulina, a sadrže visok udio glutaminske kiseline (+ glutamin) i prolina (Preston i Kruger, 1986.). Istraživanja su pokazala da ekstrakcijom u vodeno-alkoholnom mediju uz prisustvo reducirajućeg agensa jedan manji dio glutelinske frakcije biva rascijepan na podjedinice i SDS-PAGE-om se detektira kao D-hordeinska frakcija (Lásztity, 1999.).

U novije vrijeme proteini zrna ječma se klasificiraju na osnovi njihove funkcionalne važnosti u tri grupe: skladišni proteini, metabolički proteini i zaštitni (protektivni) proteini (Shewry i Halford, 2002.).

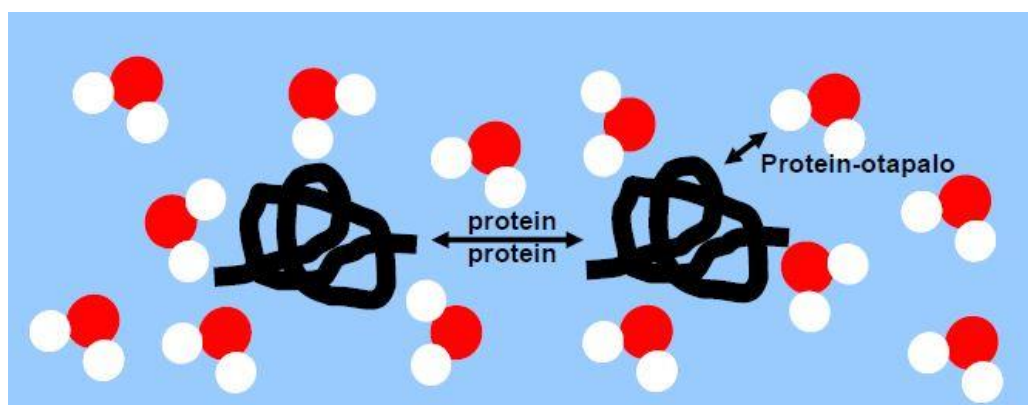
Tablica 2 Klasifikacija proteina ječma (Lásztity, 1999.; Preston i Kruger, 1986; Shewry i Halford, 2002.)

Proteinska frakcija	Topljivost proteina	Funkcija proteina	Lokalizacija
Albumini	Topljivi u vodi	Metabolički proteini	Aleuronski sloj i embrio
		Zaštitni proteini	Aleuronski sloj, embrio, endosperm
Globulini	Topljivi u otopinama soli	Metabolički proteini	Aleuronski sloj i embrio
		Skladišni proteini	Aleuronski sloj, embrio i endosperm
Hordeini (prolamini)	Topljivi u vodenom-alkoholnom mediju uz reducirajući agens	Skladišni proteini	Endosperm
Glutelini	Topljivi u razblaženim otopinama kiselina i lužina	Metabolički proteini Skladišni proteini	Endosperm
	Topljivi u otopinama soli		Aleuronski sloj, embrio, endosperm
(D-hordeini)	Topljivi u vodenom-alkoholnom mediju uz reducirajući agens		
	Topljivi u otopinama deterdženata i/ili kaotropnih reagensa		

2.3. TOPLJIVOST PROTEINA

Proteini pokazuju određena funkcionalna svojstva kao što su topljivost, stabiliziranje emulzija te stvaranje pjene. Između svih svojstava upravo je topljivost najvažnija zbog svog značajnog utjecaja na ostala funkcionalna svojstva (Kinsella, 1976.; Vojdani, 1996.).

Topljivost proteina je funkcija dva tipa interakcija (**Slika 2**). To su interakcije protein-protein i interakcije protein-otapalo. Pri tome se prvenstveno misli na topljivost proteina u vodenj sredini tako da se interakcije protein-otapalo odnose na vodikove veze dok su interakcije između proteinskih molekula ionske interakcije (Strelec, 2013.). Topljivost će biti veća ukoliko su i interakcije protein-otapalo veće. U slučaju jačih interakcija protein-protein tj. većeg međusobnog privlačenja proteinskih molekula smanjuje se ukupna površina proteina izložena otapalu te topljivost proteina opada (Strelec, 2009.).



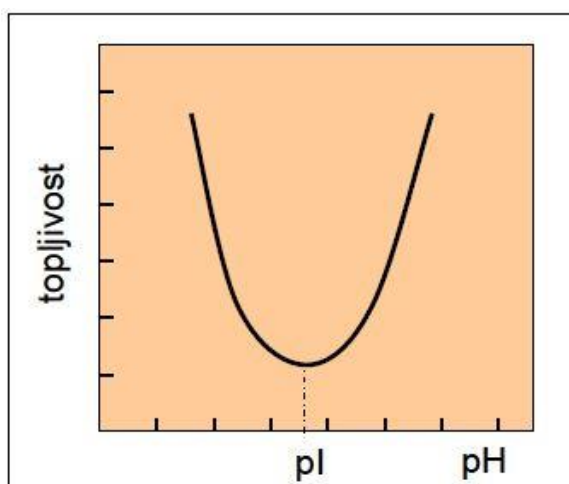
Slika 2 Topljivost proteina (Strelec, 2013.)

Topljivost proteina posljedica je sadržaja i položaja hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselina u proteinu. Uz navedeno, topljivost ovisi o još nekoliko čimbenika:

- koncentraciji otopljenih soli (ionskoj jakosti),
- polarnosti otapala,
- pH i
- temperaturi (Strelec, 2009.).

2.3.1. Ovisnost topljivosti o pH

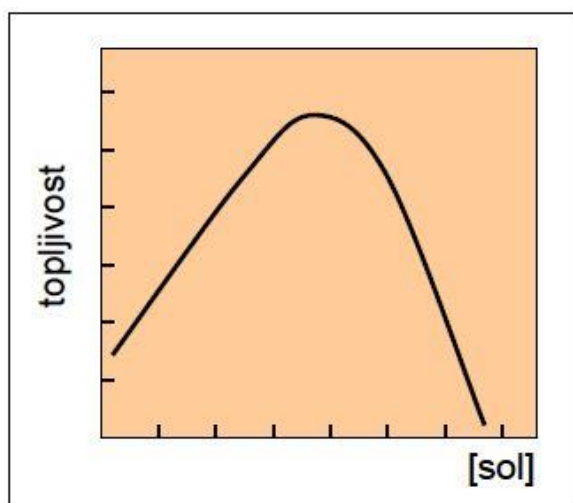
Proteini u vodenim otopinama sadrže određen broj pozitivnih i/ili negativnih naboja što ovisi o pH otopine. Naime, bočni ogranci aminokiselina koje su sastavni dijelovi proteina posjeduju sposobnost ionizacije. Tako pri kiselom pH proteinska molekula nosi pozitivan naboj budući da su amino i karboksilne skupine bočnih ogranaka nedisocirane (Strelec, 2013.). Samim time i interakcije protein-otapalo su veće u odnosu na protein-protein interakcije te je i topljivost proteina veća. Daljnjim povišenjem pH dolazi do disocijacije karboksilnih skupina, te pri točno određenoj pH vrijednosti proteini posjeduju jednaku količinu pozitivnih i negativnih naboja tj. nalaze se u izoelektričnoj točki. Tada je topljivost proteina najmanja (**Slika 3**). Povećavamo li i dalje pH otopine dolazi do disocijacije tiolne skupine bočnih ogranaka cisteina, hidroksilne skupine bočnih ogranaka tirozina te amino skupina bočnih ogranaka bazičnih aminokiselina. Proteinska molekula imati će tada negativan naboj i topljivost će biti veća uslijed povećanja protein-otapalo interakcija. Sumarno možemo zaključiti da je topljivost proteina najmanja u izoelektričnoj točki proteina dok se povišenjem ili sniženjem pH otopine topljivost povećava (Strelec, 2013.).



Slika 3 Ovisnost topljivosti proteina o pH otopine (Strelec, 2013.)

2.3.2. Ovisnost topljivosti o koncentraciji soli

Sol utječe na topljivost proteina ovisno o koncentraciji (**Slika 4**). Dodatkom soli u otopinu proteina dolazi do disocijacije soli te se nastali ioni vežu se za kisele i bazične skupine bočnih ogranaka aminokiselina na površini proteina ionskim vezama te se time povećava hidrofilnost proteinske molekule. Ona jače privlači molekule vode tj. pojačavaju se protein-otapalo interakcije a samim time povećava se i topljivost proteina (Strelec, 2009.).



Slika 4 Ovisnost topljivosti proteina o koncentraciji soli u otopini (Strelec, 2013.)

Povećavanjem koncentracije soli u otopini ioni soli nastaviti će se vezati za površinu proteina sve dok protein kod određene koncentracije soli ne postigne maksimalnu topljivost odnosno dok na svim nabojima na površini proteina ne budu vezani ioni soli. Nakon toga, daljnjim povećanjem koncentracije soli u otopini, ioni soli najprije privlače slobodne molekule vode iz otopine za vlastitu hidrataciju, a zatim kao jači elektroliti počinju privlačiti i molekule vode iz hidratacijskog ovoja proteina te i sa same površine proteinske molekule. Dolazi do smanjenja protein-otapalo interakcija i povećanja protein-protein interakcija tj. topljivost proteina se smanjuje. U slučaju kad topljivost proteina padne ispod njegove koncentracije u otopini, dolazi do taloženja proteina (Strelec, 2009.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu proteina i peptida, te količinu slobodnih amino skupina ekstrahiranih iz cjelovitog brašna ječma. Dodatno je utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu proteina ispitan pomoću SDS-PAGE.

3.2. UZORCI I KEMIČALIJE

Uzorci ječma iz žetve 2013. godine šest različitih sorti: Vanessa, Prestige, Barun, Zlatko, Scarlett i Mombasa, ispitani su u ovom istraživanju.

Natrijev fosfat, goveđi serumski albumin (BSA), ditiotreitol i natrijev tetraborat dobavljeni su od Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka), Bradfordov reagens dobavljen od Biorada (Njemačka), n-butanol, klorovodična kiselina (HCl), metanol, trikloroctena kiselina (TCA), natrijev hidroksid, *o*-fosfatna kiselina, ledena octena kiselina i borna kiselina od Kemike (Zagreb, Hrvatska), dok su akrilamid, bis-akrilamid, tris(hidroksimetil)aminometan (Tris), natrijev dodecil-sulfat (SDS), amonijev persulfat (APS), glicin, glicerol i Phast Gel Blue R-350 dobavljeni od Amersham Biosciences (Uppsala, Švedska).

3.3. PRIPREMA UZORAKA

Svih šest uzoraka ječma (Vanessa, Prestige, Barun, Zlatko, Scarlett i Mombasa) izmiješano je u mlinu tipa IKA LABORTECHNIK: MF 10 basic (IKA – WERKE, GMBH & CO. KG, D-79219 Staufen, Njemačka). Dobiveno cjelovito brašno ječma korišteno je u daljnjim analizama.

3.4. EKSTRAKCIJA PROTEINA I PEPTIDA

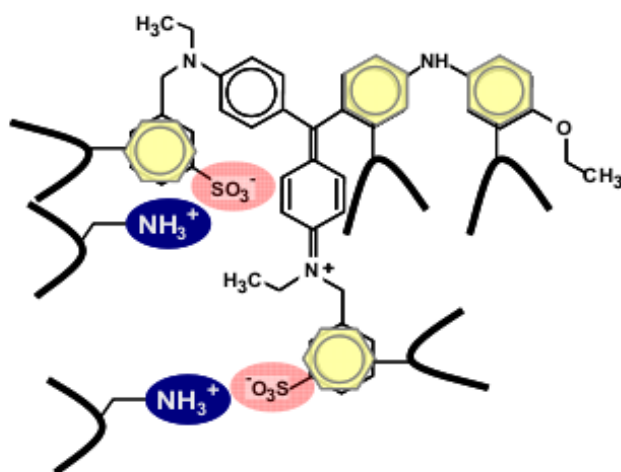
Brašno određene sorte (1,5 g) pomiješano je sa 7,5 mL: a) hladnog Britton-Robinsonova pufera određenog pH (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 te 11), b) Milli Q vode ili c) 0,5 M NaCl. Suspenzije su homogenizirane vorteksiranjem tijekom 30 sekundi te je ekstrakcija pri +4 °C provedena tijekom jednog sata uz vorteksiranje 30 sekundi nakon svakih deset minuta. Po isteku vremena ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem pri 15000 *g* i temperaturi +4 °C tijekom 10 minuta. Dobiveni ekstrakti odvojeni su od taloga dekantiranjem te korišteni za određivanje koncentracije proteina, količine slobodnih amino skupina, elektroforetska razdvajanja, te pripremu TCA supernatanta.

TCA supernatanti pripremljeni su prema sljedećoj proceduri: 2 mL pripremljenog ekstrakta pomiješano je sa 2 mL 10% TCA. Suspenzije su homogenizirane vorteksiranjem te su proteini istaloženi tijekom 10 minuta pri +4 °C. Po isteku vremena TCA supernatanti su izbistreni centrifugiranjem pri 15000 g i temperaturi +4 °C tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatanti odvojeni su od taloga dekantiranjem te korišteni za određivanje koncentracije proteina i slobodnih amino skupina.

Stupnjevita ekstrakcija proteina provedena je na sljedeći način: nakon ekstrakcije s Milli Q vodom prema gore navedenoj proceduri, dobiveni talozi su nakon centrifugiranja podvrgnuti ekstrakciji pomoću 0,5 M NaCl. Tako dobiveni ekstrakti korišteni su za određivanje koncentracije proteina, količine slobodnih amino skupina, elektroforetska razdvajanja, te pripremu TCA supernatanta.

3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Određivanje količine proteina u ekstraktima i TCA supernatantima provedeno je metodom po Bradfordici (1976.). Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina (**Slika 5**). Posljedica toga je stvaranje kompleksa protein-boja koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (Strelec, 2009.).



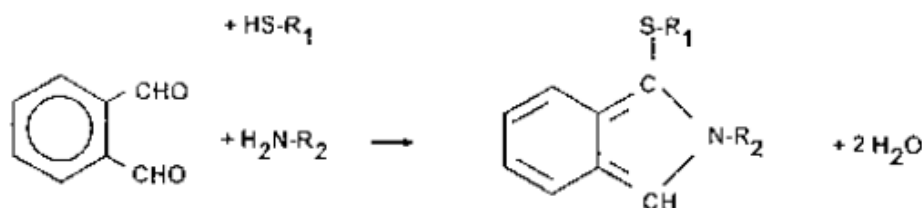
Slika 5 Princip određivanja količine proteina metodom po Bradfordici (Strelec, 2009.)

Ekstraktu (20 μL) je dodano 80 μL Milli Q vode i 2 mL Bradfordovog reagensa te je smjesa ostavljena stajati pri sobnoj temperaturi tijekom pet minuta. Intenzitet razvijene boje mjereno je spektrofotometrom pri 595 nm uz slijepu probu, koja je umjesto ekstrakta sadržavala pufer za ekstrakciju. Kod mjerenja koncentracije proteina u TCA supernatantima postupak je bio isti, izuzev što je uzorku (100 μL) samo dodano 2 mL Bradfordovog reagensa, a u slučaju slijepe probe korištena je smjesa TCA/pufer za ekstrakciju u odnosu 1:1.

Količina proteina prisutna u ekstraktima i TCA supernatantima preračunata je na osnovu baždarne krivulje pripravljene pomoću poznatih koncentracija goveđeg serumskog albumina (BSA).

3.6. ODREĐIVANJE SLOBODNIH AMINO SKUPINA

Količina slobodnih amino skupina određivana je pomoću *o*-ftaldialdehid metode prema Nielsenu i sur. (2001.).



Slika 6 OPA reakcija (Nielsen i sur., 2001.)

OPA reagens je pripremljen neposredno prije korištenja na sljedeći način: 80 mg *o*-ftaldialdehida otopljeno je u 2 mL metanola i zatim dodano u 50 mL 0,1 M natrijevog tetraborata. Ovoj su otopini potom dodani 100 mg ditiotreitola, 5 mL 20% natrijeva dodecil-sulfata i reagens je nadopunjen destiliranom vodom do 100 mL.

Količina ukupnih amino skupina određena je na sljedeći način: 20 μL uzorka pomiješano je sa 80 μL Na-fosfatnog pufera i 1 mL OPA reagensa u kivetu. Smjesa je promućkana inverzijom i nakon 2 min određena je apsorbancija pri 340 nm. Mjerenje je provedeno u 3 paralele uz slijepu probu koja je sadržavala 80 μL Na-fosfatnog pufera, 20 μL pufera za ekstrakciju i 1 mL OPA reagensa. U svrhu dobivanja pravovaljanih rezultata provedeno je i mjerenje apsorbancije kontrole ekstrakta koja se sastojala od 20 μL uzorka, 80 μL Na-fosfatnog pufera i 1 mL 0,1 M tetraborata. Apsorbancija kontrole ekstrakata oduzeta je od vrijednosti

apsorbancije ekstrakata uz OPA reagens te je količina slobodnih amino skupina izračunata na osnovi baždarne krivulje pripremljene sa poznatim koncentracijama aminokiselina valin, lizin i glutaminska kiselina.

3.7. SDS-PAGE

Razdvajanje proteina prema relativnoj molekularnoj masi provedeno je gel-elektroforezom u prisutnosti natrijeva dodecil-sulfata tj. SDS-PAGE (eng. *SodiumDodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Korišten je vertikalni sustav za elektroforezu Hoefer SE 600 Ruby. Elektroforeza je provedena paralelno u dva gela dimenzija: 160 x 180 x 1,5 mm. Gelovi su se sastojali od dva dijela: 40 mm gela za sabijanje (5% T, 2,6% C, 0,1% (w/v) SDS, 125 mM Tris-HCl pufer pH 6,8) i 140 mm gela za razdjeljivanje (10% T, 2,6% C, 0,1% (w/v) SDS, 375 mM Tris-HCl pufer pH 8,9). Uzorci i standardi proteina su nanošeni u utore gela i elektroforeza je provedena oko 3 h i 30 minuta tj. dok fronta boje bromfenol modrila nije stigla do ruba ploče. Uvjeti elektroforeze za dva gela istovremeno su bili: napon 600 V i jakost struje 60 mA te temperatura 15 °C. Pufer za elektroforezu bio je sastava: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3. Po završetku elektroforeze gelovi su fiksirani uranjanjem u 10% otopinu trikloroctene kiseline (TCA) tijekom 60 minuta, te je potom uslijedilo bojanje u otopini za bojanje (0,1% PhastGel Blue R u 30% metanolu i 10% octenoj kiselini) tijekom noći na orbitalnoj tresilici. Nakon bojanja, gelovi su odbojani otopinom za odbojavanje (metanol:ledena octena kiselina:destilirana voda u omjeru 3:1:6) i to uz 4 izmjene otopine za odbojavanje nakon svakih 20 minuta, a po isteku odbojavanja gelovi su dokumentirani fotografiranjem kako bi se mogli koristiti u obradi rezultata.

3.8. STATISTIČKA ANALIZA

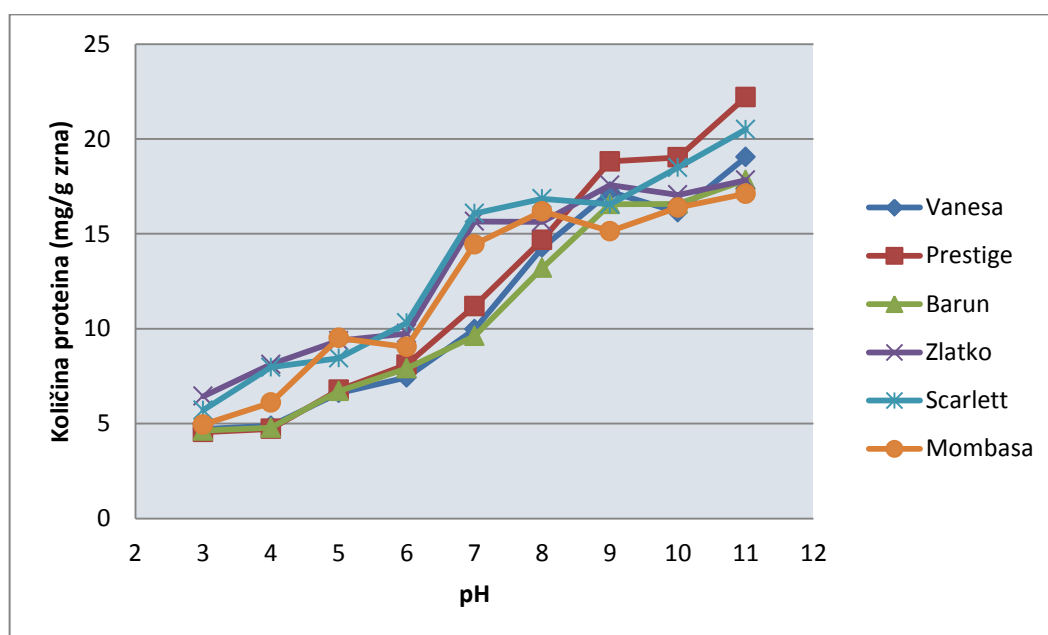
Srednje vrijednosti i standardne devijacije ispitivanih parametara neovisnih ekstrakcija izračunate su pomoću programa Statistica (Stat Soft, SAD). Grafički prikazi utjecaja pH na ekstraktibilnost izrađeni su pomoću programa Excel (Microsoft, Hrvatska).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu proteina i peptida, te količinu slobodnih amino skupina ekstrahiranih iz cjelovitog brašna šest sorti ječma.

4.1. UTJECAJ pH NA KOLIČINU EKSTRAHIRANIH PROTEINA I PEPTIDA

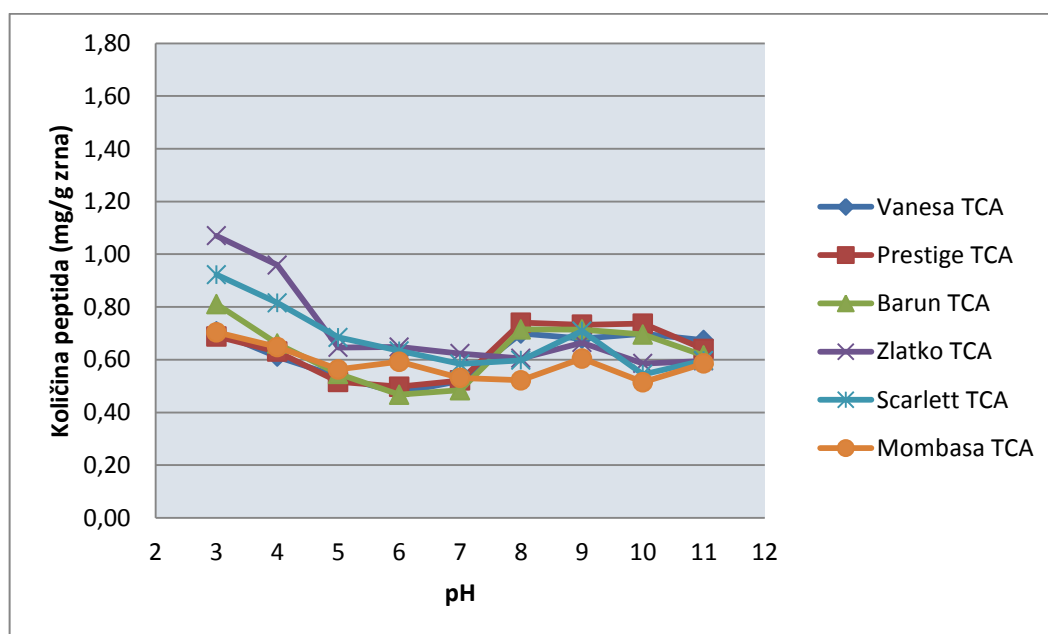
Količina proteina u ekstraktima i TCA supernatantima pripremljenih iz cjelovitog brašna ispitivanih sorti ječma određena je metodom po Bradfordici (1976.). Analiza ekstrakata pokazala je značajan utjecaj pH na količinu ekstrahiranih proteina (**Slika 7**). Naime, porastom pH ekstrakcijskog otapala došlo je do značajnog povišenja količine ekstrahiranih proteina. Tako je pri pH 3 ekstrahirano najmanje proteina (oko 5 mg/g zrna), a maksimalne količine ekstrahiranih proteina postignute su pri pH 11. Pri ovom pH količina proteina se ovisno o ispitivanoj sorti kretala u rasponu od 17,1 do 22,2 mg/g zrna, znači bila je gotovo četverostruko viša nego pri pH 3.



Slika 7 Utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu proteina ekstrahiranih iz cjelovita brašna ječma

Sličan trend porasta ekstraktibilnosti proteina ječma s povišenjem pH ekstrakcijskog otapala pronašli su Yalçın i Çelik (2007.) koji su pripisali porast ekstraktibilnosti proteina udaljavanju proteina od njihove izoelektrične točke. Naime, navedeni autori navode da se izoelektrična točka proteina ječma nalazi u području oko pH 6, te se povećanje topljivosti proteina pri pH vrijednostima višim ili nižim od pH 6 može pripisati povećanju topljivosti proteina zbog

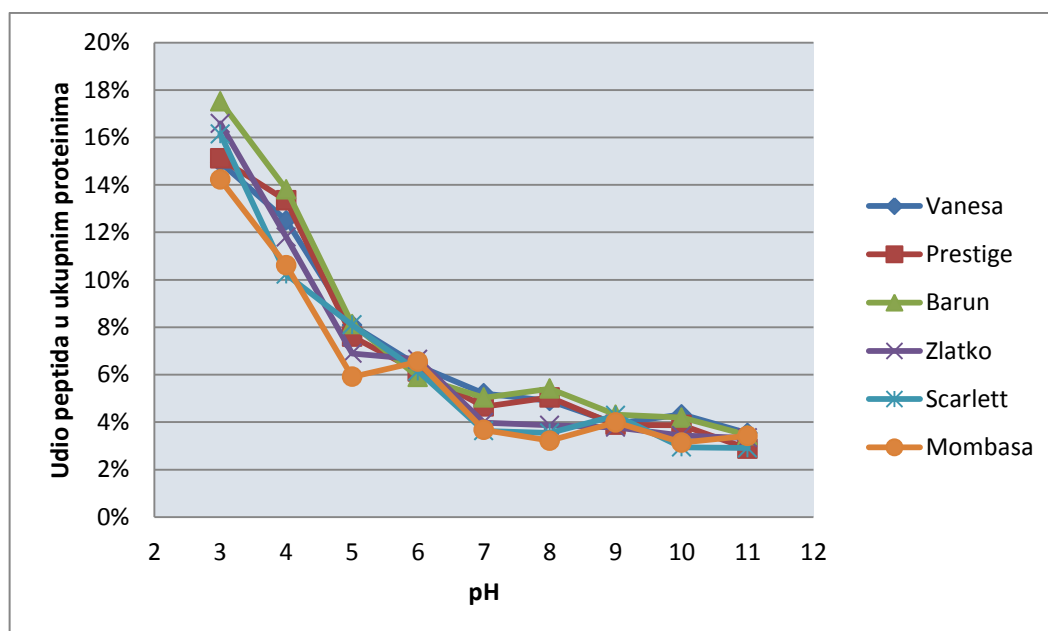
udaljavanja od njihove izoelektrične točke. Međutim, tvrdnja o izoelektričnoj točki proteina ječma oko pH 6 je djelomično u suprotnosti sa istraživanjima Streleca i sur. (2012.) koji su primjenom izoelektričnog fokusiranja pokazali da glavna proteina albuminsko-globulinske frakcije ječma posjeduje izoelektričnu točku u području pH od 3 do 5. Upravo istraživanja Streleca i sur. (2012.) potvrđuju rezultate ovog istraživanja, budući se u rasponu pH od 3 do 5 bilježi blag porast ekstraktibilnosti proteina, nakon čega ekstraktibilnost proteina značajno raste. Naime, kako je topljivost proteina najmanja u izoelektričnoj točki pri tim pH vrijednostima će se ekstrahirati i najmanja količina proteina. Daljnjim povećanjem pH otopine i udaljavanjem od izoelektrične točke dolazi do povećanja interakcija između proteina i otapala što dovodi do povećane topljivosti proteina (Strelec, 2009.). Glavni razlog povećanju topljivosti proteina su disocijacija tiolne skupine bočnih ogranaka cisteina, hidroksilne skupine bočnih ogranaka tirozina, te amino skupina bočnih ogranaka bazičnih aminokiselina što dovodi do kidanja elektrostatskih interakcija između bočnih ogranaka i slijednog povećanja interakcija otapala i proteina.



Slika 8 Utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu peptida iz cjelovita brašna ječma

Kako bi se odredio utjecaj pH na ekstrakciju peptida, pripremljeni ekstrakti podvrgnuti su taloženju proteina pomoću TCA, te su na takav način dobiveni TCA supernatanti koji su sadržavali male peptide. Određivanje količine peptida u TCA supernatantima pomoću Bradfordiće metode pokazalo je na prisustvo malih količina peptida (**Slika 8**). Ovisno o

sorti, količina ekstrahiranih peptida kretala se od 0,4 do 1,1 g/mg zrna. Kao i u slučaju proteina mogao se uočiti značajan utjecaj pH na ekstraktibilnost peptida. Međutim, za razliku od proteina najveća količina peptida ekstrahirana je upravo pri najnižim pH vrijednostima (pH 3), dok se povećanjem pH udio ekstrahiranih peptida smanjio, te poprimio više-manje ujednačenu količinu nakon pH 6. Ovo upućuje da mali peptidi ekstrahirani iz cjelovitog brašna ječma sadrže povećani udio bazičnih aminokiselina. Naime, pri pH 3-6 bočni ogranci bazičnih aminokiselina (His, Lys, Arg) posjeduju pozitivan naboj što utječe na povećanu topljivost, a time i ekstraktibilnost. Štoviše, blago sniženje ekstraktibilnosti peptida prema pH 6 upućuje na potencijalno visok udio histidina u peptidima, budući da bočni ogranci histidina približavajući se pH vrijednosti od 6,8 postaju sve manje nabijeni, odnosno gube naboj.

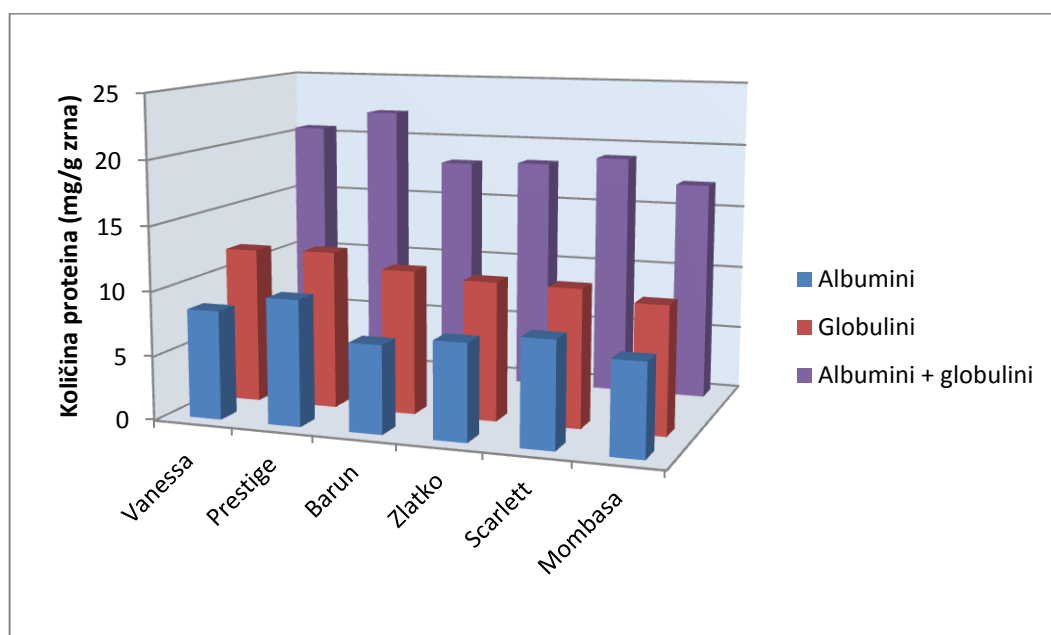


Slika 9 Udio peptida u ukupnim proteinima (%)

Obzirom da je pri pH 3 zabilježen najmanji udio ekstrahiranih proteina (**Slika 7**), a najveći udio ekstrahiranih peptida (**Slika 8**), ispitan je utjecaj peptida na količinu proteina detektiranih Bradfordčinom metodom i to određivanjem udjela peptida u ukupnim proteinima (**Slika 9**). Rezultati analize su pokazali da pri najnižem pH peptidi čine između 14 i 18% od ukupne količine proteina. Porastom pH doprinos peptida ukupnim proteinima se smanjio sukladno porastu količine ekstrahiranih proteina. Tako je pri pH 11 udio peptida u

ukupnim proteinima iznosio od 3 do 4%. Ovo upućuje da mali peptidi značajno doprinose ukupnoj količini proteina pri pH 3-6.

Kako su proteini iz cjelovita brašna ječma ekstrahirani Britton-Robinsonovim puferom koji u svom sastavu uključuje soli kiselina i lužina, to je količina proteina ekstrahirana ovim puferom uspoređena sa količinom proteina stupnjevito ekstrahiranih prema Osborneu (1895.). Naime, prema Osborneu vodom se ekstrahiraju albumini, blagim otopinama soli globulini, a blagim otopinama kiselina ili lužina glutenini. Stoga, kako bi se ustanovilo koja se frakcija proteina ječma ekstrahira Britton-Robinsonovim puferom uspoređena je količina proteina ekstrahiranih ovim puferom sa količinom albumina i globulina ekstrahiranih stupnjevitom ekstrakcijom prema Osborneu koja je uključivala ekstrakciju albumina iz cjelovita brašna ječma pomoću vode, a potom slijednu ekstrakciju sa 0,5 M otopinom natrijeva klorida (**Slika 10**).

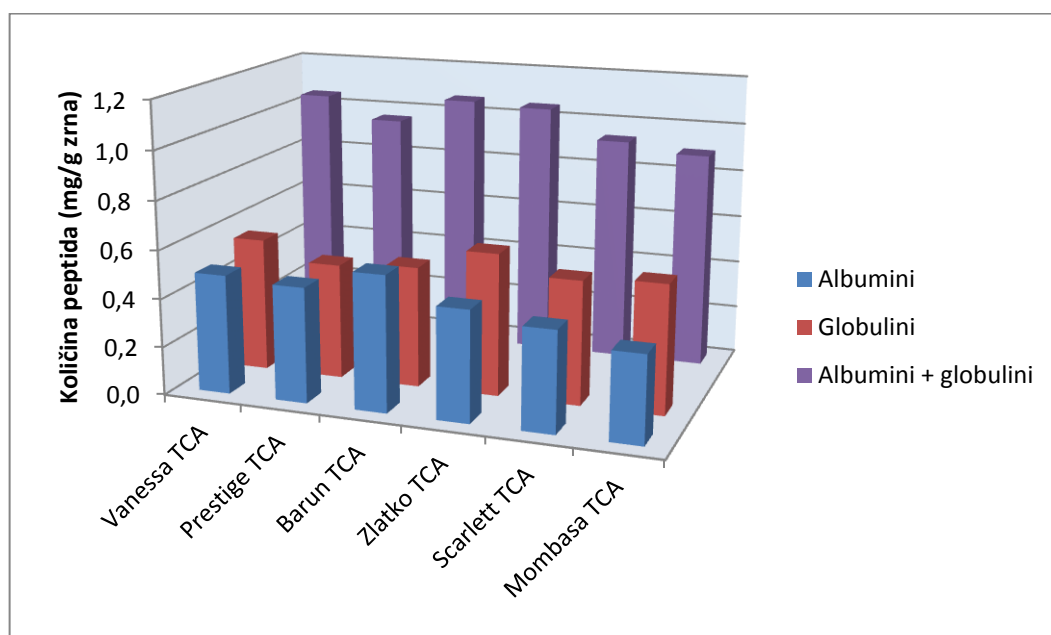


Slika 10 Količina proteina ekstrahirana iz cjelovita brašna ječma stupnjevitom ekstrakcijom

Količina proteina (albumina) ekstrahirana iz cjelovita brašna ječma pomoću Milli Q vode iznosila je oko 8 mg/g zrna, dok je količina proteina (globulina) dobivena naknadnom ekstrakcijom pomoću 0,5 M NaCl bila nešto veća te iznosila oko 11 mg/g zrna, što upućuje da svih šest sorti ječma sadrže veću količinu globulina. Kada su ove dvije frakcije proteina (albumini i globulini) sumirane količinski, ukupna količina albumina i globulina ekstrahirana iz cjelovita brašna ječma iznosila je oko 20 mg/g zrna ovisno o ispitivanoj sorti ječma što je u

skladu i sa količinom proteina dobivenom ekstrakcijom Britton-Robinsonovim puferom pri pH 11. Iz navedenog se može zaključiti da se Britton-Robinsonovim puferom iz brašna cjelovita zrna ječma ekstrahiraju albumini i globulini ječma.

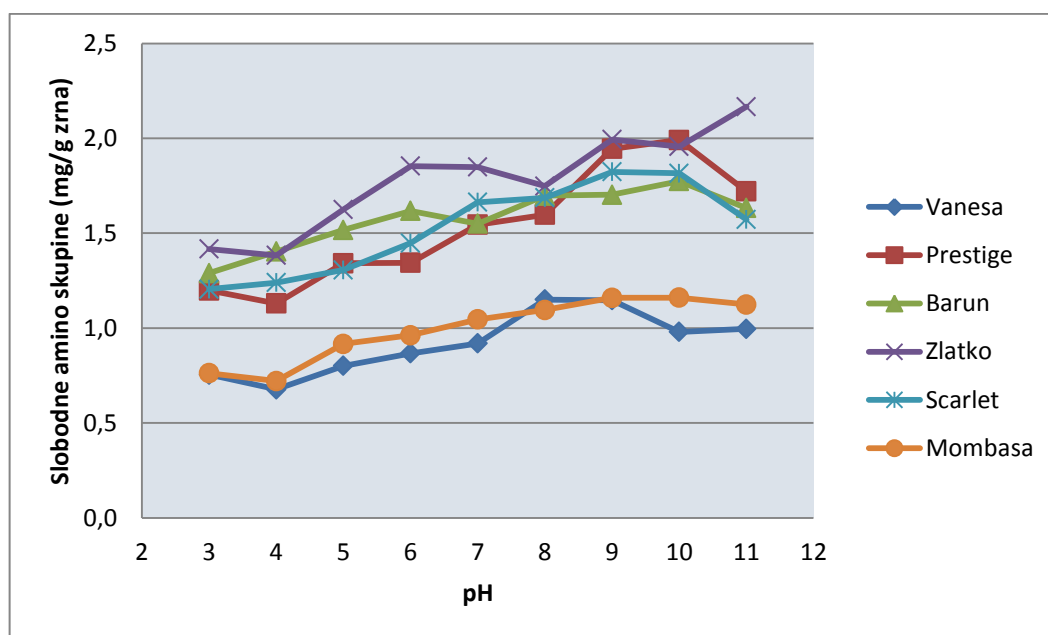
Obzirom da je analiza količine proteina stupnjevitom ekstrakcijom prema Osborneu pokazala da se Britton-Robinsonovim puferom najvjerojatnije ekstrahiraju albumini i globulini, ekstrakti dobiveni stupnjevitom ekstrakcijom podvrgnuti su taloženju proteina pomoću TCA te je u tako dobivenim TCA supernatantima određena količina peptida (**Slika 11**). Rezultati analize su pokazali da se vodom ekstrahira oko 0,4 mg/g peptida, a pomoću 0,5 M NaCl oko 0,5 mg/g peptida. Suma količine peptida ekstrahirana stupnjevitom ekstrakcijom, bila je približno jednaka količini peptida ekstrahiranih Britton-Robinsonovim puferom u rasponu vrijednosti pH 3-5, što je dodatno potvrdilo da se Britton-Robinsonovim puferom ekstrahiraju albumini i globulini ječma.



Slika 11 Količina peptida ekstrahirana iz cjelovita brašna ječma stupnjevitom ekstrakcijom

4.2. UTJECAJ pH NA KOLIČINU SLOBODNIH AMINO SKUPINA

Osim što služe kao pokazatelj količine aminokiselina i peptida, slobodne amino skupine mogu poslužiti kao pokazatelj stupnja hidrolize proteina (Nielsen i sur., 2001.), procesa umrežavanja proteina transglutaminazom (Huang i sur., 2010.), te kao pokazatelj stupnja glikolizacije proteina (Bielikowicz i sur., 2010.). Kako bi se odredio utjecaj pH na ekstraktibilnost slobodnih amino skupina u ekstraktima i TCA supernatantima dobivenim iz cjelovita brašna ječma provedeno je određivanje količine slobodnih amino skupina o-ftaldialdehid metodom prema Nielsenu i sur. (2001.).

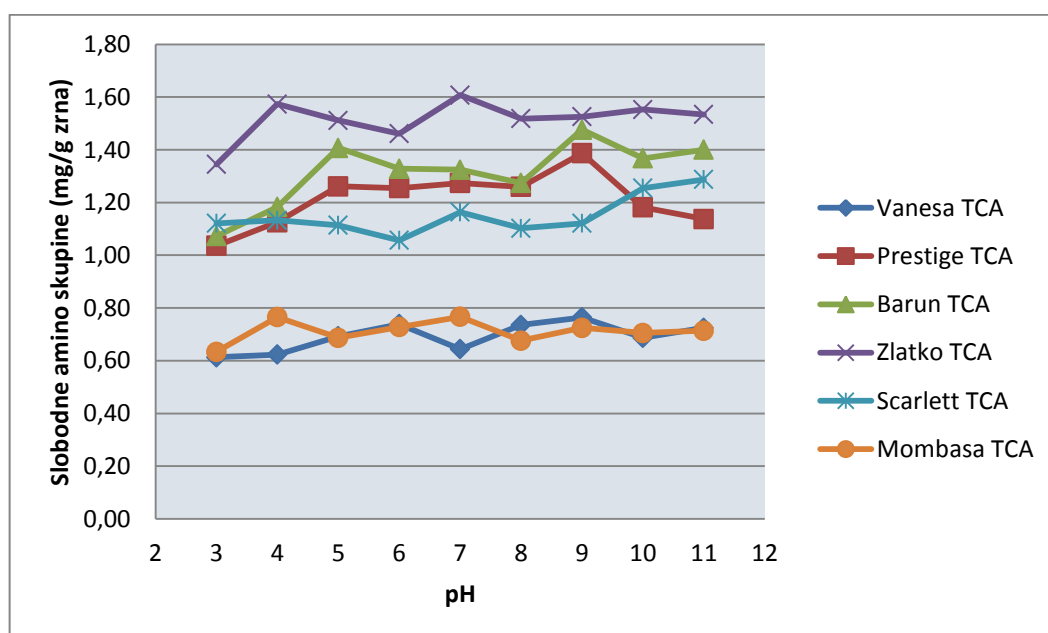


Slika 12 Utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu slobodnih amino skupina u ekstraktima cjelovitog brašna ječma

Analiza ekstrakata pokazala je blagi utjecaj pH na količinu ekstrahiranih slobodnih amino skupina (**Slika 12**). Naime, porastom pH ekstrakcijskog otapala došlo je do blagog povišenja količine slobodnih amino skupina. Najmanja količina slobodnih amino skupina ekstrahirana je pri pH 3 i iznosila je od 0,7 do 1,4 mg/g zrna, a najveće količine postignute su pri pH 11 i kretale su se u rasponu od 1,0 do 2,2 mg/g zrna ovisno o ispitivanoj sorti. Ključno je naglasiti da je trend porasta slobodnih amino skupina slijedio trend porasta ekstrahiranih proteina, što ne začuđuje budući se OPA metodom detektiraju i amino skupine bazičnih bočnih ograna. Međutim, trend porasta slobodnih amino skupina je bio znatno blaži nego trend porasta količine ekstrahiranih proteina. Najvjerojatniji razlog tomu je značajan utjecaj

slobodnih aminokiselina i malih peptida na detektiranu količinu ukupnih amino skupina, kao i smanjena količina bazičnih bočnih ogranaka u proteinima ekstrahiranim pri višim pH vrijednostima što se odrazilo na nešto slabiji trend porasta ukupnih amino skupina.

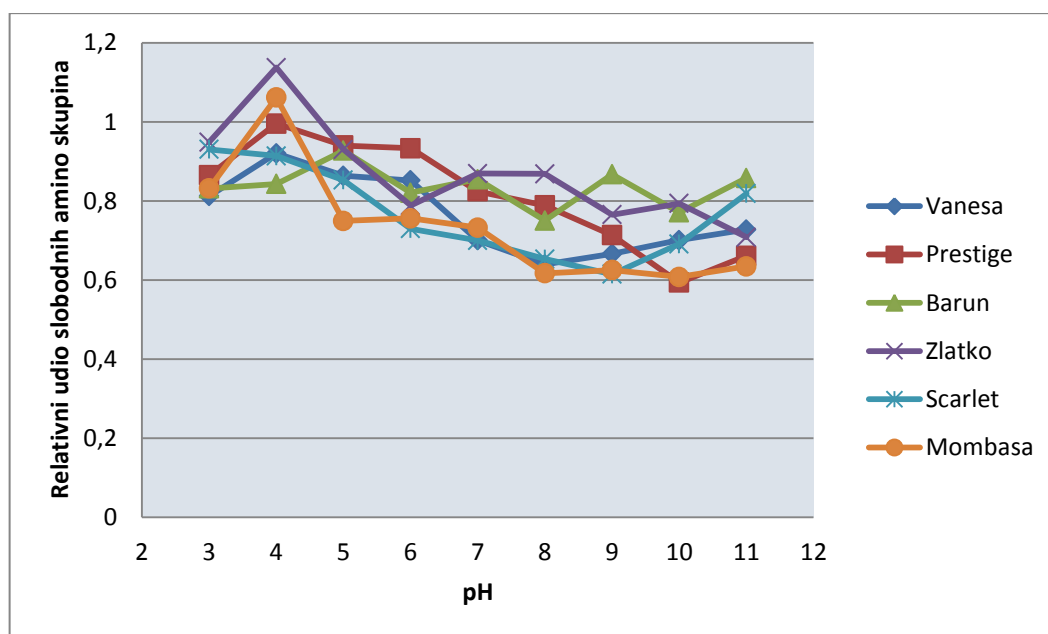
Kako bi se potvrdio značajan utjecaj slobodnih aminokiselina i malih peptida na količinu detektiranih amino skupina, određivanje slobodnih amino skupina provedeno je i u TCA supernatantima. Rezultati analize (**Slika 13**) pokazali su da TCA supernatanti sadrže značajnu količinu slobodnih amino skupina te da po količini detektiranih skupina, izuzetno doprinose količinama detektiranim u slučaju ekstrakata. Ovisno o sorti količina slobodnih amino skupina kretala se u rasponu od 0,7 do 1,5 mg/g zrna. Međutim, gotovo ujednačena koncentracija slobodnih amino skupina pri svim pH vrijednostima pokazala je da pH nema gotovo nikakav utjecaj na povećanje ekstraktibilnosti slobodnih amino skupina u TCA supernatantima. Time je i indirektno potvrđena pretpostavka da se blagi trend porasta slobodnih amino skupina uočen u ekstraktima može pripisati prije svega ekstrakciji proteina sa sniženih udjelom bazičnih bočnih ogranaka pri višim pH vrijednostima.



Slika 13 Utjecaj pH ekstrakcijskog otapala na količinu slobodnih amino skupina u TCA supernatantima

Obzirom da je količina slobodnih amino skupina u TCA supernatantima bila vrlo slična količinama izmjerenim u ekstraktima provedena je analiza doprinosa slobodnih amino skupina u TCA supernatantima količini slobodnih amino skupina izmjerenim u ekstraktima

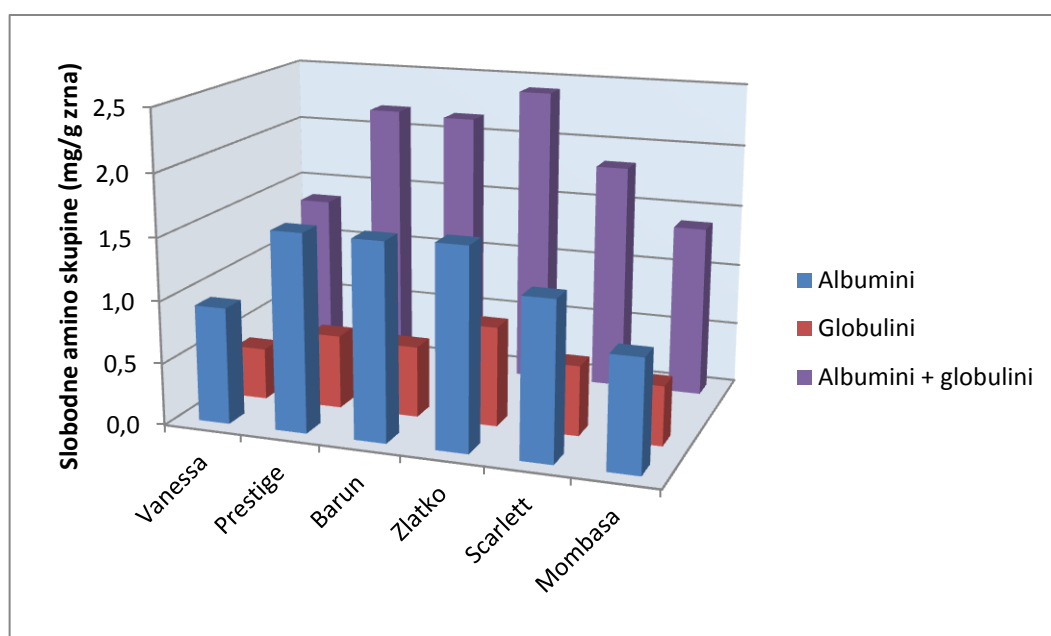
(Slika 14). Rezultati su pokazali da u rasponu pH vrijednosti 3-5 glavina amino skupina detektiranih u ekstraktima zapravo potječe od amino skupina prisutnih u TCA supernatantima. U navedenom pH području amino skupine TCA supernatanta činile su 80 do 100% količine zabilježene u ekstraktima. Daljnjim povišenjem pH u rasponu od 5-7 može se uočiti sniženje doprinosa slobodnih amino skupina TCA supernatanta količini amino skupina u ekstraktima, koje se nakon pH 7, više-manje ustaljuje na 60-80% doprinosa. Sličan, ali znatno niži trend doprinosa uočen je analizom udjela peptida TCA supernatanta u ukupnim proteinima ekstrakata (Slika 9). I u tom slučaju je uočen značajan doprinos u području pH od 3-5, i potom ustaljenje doprinosa porastom pH vrijednosti iznad 7. Ovo isto upućuje da mali peptidi prisutni u TCA supernatantima značajno doprinose količini slobodnih amino skupina detektiranih u ekstraktima, što posebice dolazi do izražaja kada se razmotri da svega 4-5% peptida prisutnih u ekstraktima doprinosi količini detektiranih amino skupina u iznosu od 60-80%.



Slika 14 Relativni doprinos slobodnih amino skupina u TCA supernatantima količini slobodnih amino skupina u ekstraktima

Obzirom da su rezultati stupnjevite ekstrakcije pokazali da se Britton-Robinsonovim puferom ekstrahiraju albumini i globulini ječma, provedena je analiza sadržaja slobodnih amino skupina u ovim ekstraktima, kao i njihovim pripadajućim TCA supernatantima (Slika 15 i 16). Analiza ukupnih amino skupina u ekstraktima (Slika 15) pokazala je da albuminska frakcija

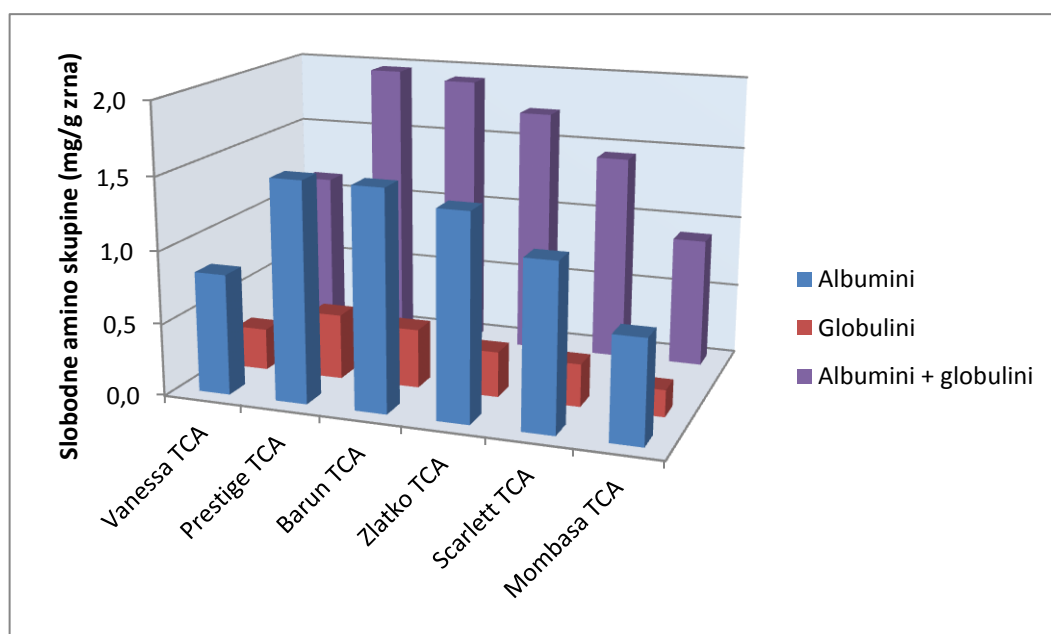
sadrži trostruko veću količinu slobodnih amino skupina od globulinske. Naime, ovisno o sorti, vodeni ekstrakti (albuminska frakcija) su sadržavali između 0,9 i 1,6 mg/g slobodnih amino skupina, a slijedni ekstrakti pomoću 0,5 M NaCl (globulinska frakcija) između 0,4 i 0,8 mg/g slobodnih amino skupina. Navedeno upućuje da je albuminska frakcija proteina znatno bogatija slobodnim amino skupinama od globulinske, pogotovo ako se uzme u obzir da rezultati analize proteina (**Slika 10**) pokazuju da se sekvencijalnom ekstrakcijom ekstrahira veća količina globulina. Kada su obje frakcije sumirane ukupna količina slobodnih amino skupina u ekstraktu kretala se između 1,3 i 2,4 mg/g ovisno o sorti što je bilo u skladu s količinom slobodnih amino skupina zabilježenom u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom pomoću Britton-Robinsonova pufera pH 11.



Slika 15 Količina slobodnih amino skupina u ekstraktima pripremljenim stupnjevitoj ekstrakcijom

Obzirom da su rezultati doprinosa slobodnih amino skupina u TCA supernatantima ukupnim amino skupinama u ekstraktima pripremljenih ekstrakcijom pomoću Britton-Robinsonova pufera različitog pH, pokazali značajan doprinos komponenti supernatanta, provedena je i analiza slobodnih amino skupina u TCA supernatantima sekvencijalnih ekstrakata (**Slika 16**). Rezultati analize su ovisno o sorti pokazali da su vodeni ekstrakti (albuminska frakcija) sadržavali između 0,7 i 1,5 mg/g slobodnih amino skupina, a slijedni ekstrakti pomoću 0,5 M NaCl (globulinska frakcija) između 0,2 i 0,4 mg/g slobodnih amino skupina, što je bilo

sukladno zamijećenom doprinosu albumina i globulina slobodnim amino skupinama u ekstraktima (**Slika 15**). Štoviše, doprinos malih peptida albuminske frakcije bio je čak i veći. Naime mali peptidi albuminske frakcije sadržavali su 3 do 5 puta veću količinu detektiranih amino skupina od malih peptida globulinske frakcije. Kada su slobodne amino skupine u TCA supernatantima sumirane, ukupna količina slobodnih amino skupina u TCA supernatantima kretala se između 0,9 i 2,0 mg/g ovisno o sorti, što se djelomično slagalo sa rezultatima ukupne količine slobodnih amino skupina prisutnih u sumi sekvencijalnih ekstrakata.



Slika 16 Količina slobodnih amino skupina u TCA supernatantima pripremljenim iz ekstrakata albumina i globulina ječma

Tablica 3 Relativni doprinos slobodnih amino skupina u TCA supernatantima količini slobodnih amino skupina u ekstraktima pripravljenim stupnjevitoj ekstrakcijom

	<i>Vanessa</i>	<i>Prestige</i>	<i>Barun</i>	<i>Zlatko</i>	<i>Scarlett</i>	<i>Mombasa</i>
Albumini	88,88%	95,37%	95,48%	87,58%	90,02%	78,89%
Globulini	69,61%	76,11%	71,33%	39,27%	52,45%	38,81%

Obzirom da su uočene količine slobodnih amino skupina u TCA supernatantima bile približno slične količini amino skupina detektiranih u sekvencijalnim ekstraktima izračunat je doprinos

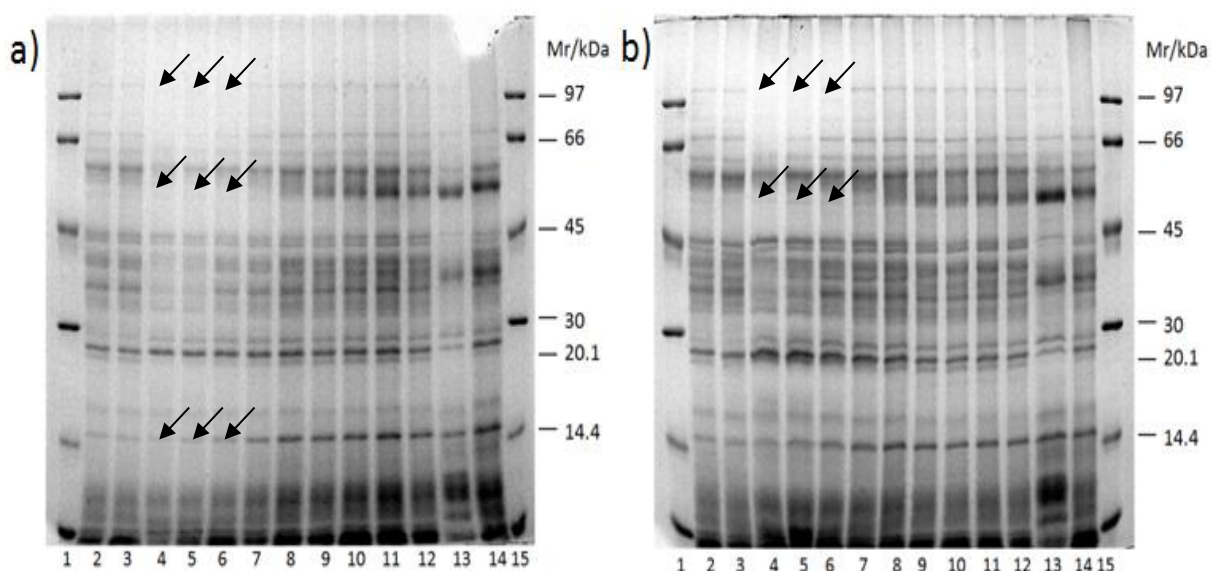
slobodnih amino skupina u TCA supernatantima količini slobodnih amino skupina izmjerenim u ekstraktima (**Tablica 3**). Rezultati su pokazali da u albuminskoj frakciji glavina amino skupina detektiranih u ekstraktima potječe zapravo od amino skupina prisutnih u TCA supernatantima i iznosi između 80-95%, ovisno o sorti. U globulinskoj frakciji doprinos slobodnih amino skupina u TCA supernatantima količini slobodnih amino skupina u ekstraktima je nešto niži i iznosi između 39-76%, ovisno o sorti.

4.3. ELEKTROFORETSKI PROFIL PROTEINA JEČMA U OVISNOSTI O pH

Kako bi se dodatno potvrdila ovisnost ekstraktibilnosti proteina ječma o primijenjenom pH provedena je SDS-PAGE analiza ekstrakata za dvije sorte ječma, *Vanessu* i *Prestige*. Pri tome je ključno naglasiti da je SDS-PAGE provedena uz dvije vrste nanošenja uzorka. U prvom su slučaju nanošeni isti volumeni uzoraka kako bi se ustanovila i potvrdila razlika u količini ekstrahiranih proteina (**Slike 17a i 18a**), a u drugom su slučaju nanošene iste količine proteina, kako bi se ustanovilo koje su to proteinske vrpce prije svega odgovorne za razlike u količini ekstrahiranih proteina (**Slike 17b i 18b**). Uz navedeno, kako bi se ustanovilo i potvrdilo da proteini ekstrahirani Britton-Robinsonovim puferom prije svega potječu od albumina i globulina ječma, na gelove su uz ekstrakte proteina dobivene ekstrakcijom Britton-Robinsonovim puferom različitog pH nanošeni i albumini ječma ekstrahirani Milli Q vodom, globulini slijedno ekstrahirani pomoću 0,5 M natrijeva klorida, te albuminsko/globulinska frakcija proteina direktno ekstrahirana pomoću 0,5 M natrijeva klorida.

Rezultati analize pokazali su postojanje značajnih razlika u količini ekstrahiranih proteina u ovisnosti o primijenjenom pH (**Slike 17a i 18a**). Pri nižim pH vrijednostima ekstrahirano je znatno manje proteina nego pri višim pH, što je vidljivo iz sniženih intenziteta proteinskih vrpce, a u skladu sa prije uočenim trendom porasta količine ekstrahiranih proteina s povišenjem pH (**Slika 7**). Naime, pri niskom pH ekstrakcijskog otapala (pH 3-5) može se uočiti da je glavnina proteinskih vrpce vrlo slabog intenziteta (**Slika 17a**, linije 4-6, **Slika 18a**, linije 3-5). Izuzetak čine proteinske vrpce molekulskih masa 25, 30 i 45 kDa čiji se intenzitet promjenom pH ili ne mijenja ili slabo mijenja (**Slike 17a i 18a**), što upućuje da ovi proteini dominiraju u ekstraktima niskog pH i čine glavninu proteina detektiranih Bradfordičinom metodom. Povišenjem pH dolazi do značajnog povećanja intenziteta glavnine proteinskih vrpce što ukazuje na veću količinu ekstrahiranih proteina pri tim pH vrijednostima. Štoviše neke proteinske vrpce molekulskih masa 14.4, 55 i 97 kDa nevidljive pri niskim pH vrijednostima (**Slike 17a i 18a**, označeno strelicama) uočavaju se pri višim pH vrijednostima, što upućuje na značajnu ovisnost ekstraktibilnosti/topljivosti proteina o primijenjenom pH. Ovaj trend porasta ekstraktibilnosti proteina ječma s povišenjem pH ekstrakcijskog otapala uočen kod određivanja količine proteina (**Slika 7**) i potvrđen pomoću SDS-PAGE (**Slike 17a i**

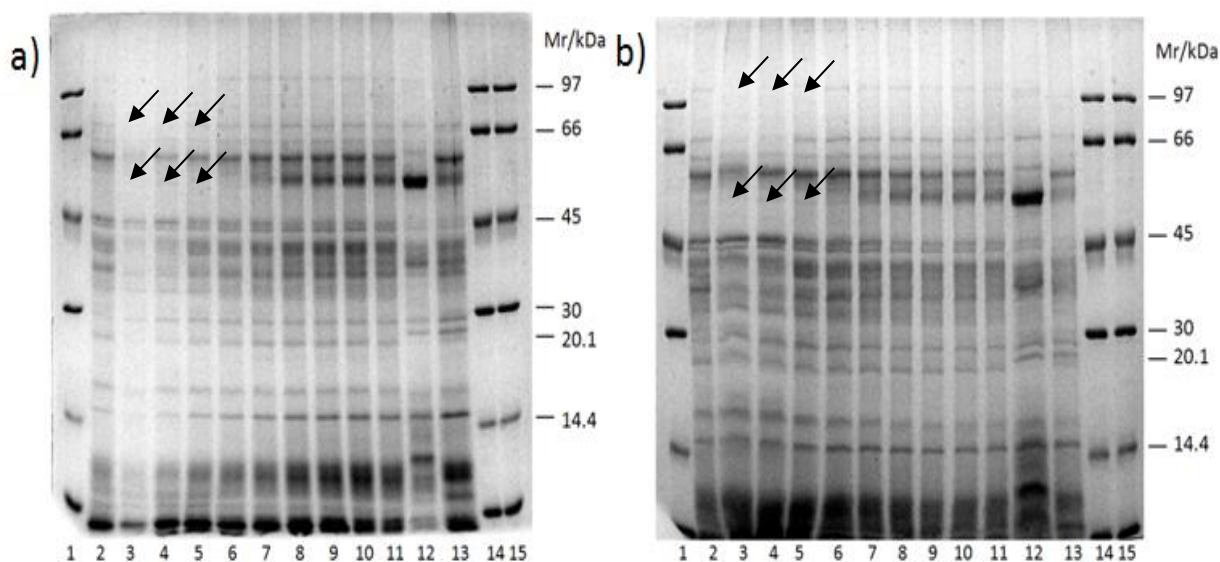
18a) je i očekivan obzirom na rezultate Streleca i suradnika (2012.) koji su pomoću IEF pokazali da glavnina proteina albuminsko/globulinske frakcije ječma posjeduje izoelektričnu točku u području pH od 3 do 5. Obzirom da je topljivost proteina najmanja u izoelektričnoj točki (Strelec, 2013.) može se očekivati da će se upravo u području pH od 3 do 5 ekstrahirati najmanja količina proteina. Ovo je upravo i uočeno. Naime, u području pH od 3 do 5 je ustanovljena najmanja topljivost/ekstraktibilnost proteina (**Slika 7**) koja se ujedno isto tako mogla uočiti i slabim intenzitetom proteinskih vrpca (**Slike 17a i 18a**). Udaljavanjem od izoelektrične točke odnosno ekstrakcijom pri višim pH vrijednostima ekstrahirana je i veća količina proteina (**Slike 17a i 18a**) što je opet u skladu sa činjenicom da se topljivost proteina povećava iznad izoelektrične točke.



Slika 17 SDS-PAGE u 10% T gelu albumina/globulina ekstrahiranih iz zrna ječma sorte *Vanessa* pomoću pufera različite pH vrijednosti, vode ili otopine 0,5 M NaCl. Stupci: niskomolekularni standardi proteina (1, 15); Milli Q voda (2, 3); pH 3-pH 11 (4-12); sekvencijalno ekstrahirani proteini pomoću 0,5 M NaCl nakon ekstrakcije Milli Q vodom (13); direktno ekstrahirani proteini pomoću 0,5 M NaCl (14). Strelice pokazuju razlike između proteinskih vrpca pri različitim pH vrijednostima. **17a**) Nanesen jednak volumen uzoraka (20 μ L). **17b**) Nanesena jednaka količina proteina (20 μ g).

Osim navedenog, rezultati SDS-PAGE (**Slike 17a i 18a**) su pokazali da se proteini ekstrahirani Britton-Robinsonovim puferom različitog pH prije svega mogu pripisati albuminima i globulinima ječma. Naime, detaljna analiza rasporeda proteinskih vrpca ekstrakata Britton-Robinsonovim puferom različitog pH (**Slika 17a**, linije 4-12; **Slika 18a**, linije 3-11), sa

rasporedom proteinskih vrpca albumina (**Slika 17a**, linije 2 i 3; **Slika 18a**, linija 2), globulina (**Slika 17a**, linija 13; **Slika 18a**, linija 12) i albuminsko/globulinske frakcije (**Slika 17a**, linija 14; **Slika 18a**, linija 13) pokazuje da proteinske vrpce prisutne u albuminskoj, globulinskoj ili albuminsko/globulinskoj frakciji pojavljuju u rasporedu proteinskih vrpca ekstrakata proteina Britton-Robinsonova pufera i to ovisno o primijenjenom pH. Naravno, moguće prisustvo gluteninskih proteinskih vrpca se ne može u potpunosti isključiti, pogotovo ukoliko se ove vrpce po molekulskoj masi poklapaju sa molekulskom masom albumina ili globulina ječma. Naime, budući su glutenini topljivi u razblaženih kiselinama i lužinama (Osborne, 1895.) postoji mogućnost da se i mala količina ovih proteina ekstrahira pomoću Britton-Robinsonova pufera.



Slika 18 SDS-PAGE u 10% T gelu albumina/globulina ekstrahiranih iz zrna ječma sorte *Prestige* pomoću pufera različite pH vrijednosti, vode ili otopine NaCl. Stupci: niskomolekularni standardi proteina (1, 14, 15); Milli Q voda (2); pH 3-pH 11 (3-11); sekvencijalno ekstrahirani proteini pomoću 0,5 M NaCl nakon ekstrakcije Milli Q vodom (12); direktno ekstrahirani proteini pomoću 0,5 M NaCl (13). Strelice pokazuju razlike između proteina pri različitim pH vrijednostima. **18a)** Nanesen jednak volumen uzoraka (20 μ L). **18b)** Nanesena jednaka količina proteina (20 μ g).

Osim pripadnosti proteina ekstrahiranih Britton-Robinsonovim puferom bilo albuminima ili globulinima ječma, mogla se i uočiti ovisnost ekstraktibilnosti određenih vrpca albumina i globulina o primijenjenom pH ekstrakcijskog otapala. Tako se pri rasponu pH od 3 do 5 može

uočiti slaba ili gotovo nikakva topljivost albumina molekulske mase oko 97 kDa, i globulina molekulske mase oko 50 kDa (**Slika 17a**, linije 4-6; **Slika 18a**, linije 3-5).

Gore navedeno je dodatno potvrđeno nanošenjem jednake količine proteina u utore gela (**Slika 17 b** i **Slika 18 b**).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka može se zaključiti sljedeće:

- pH pufera značajno utječe na količinu ekstrahiranih proteina iz cjelovitog brašna ječma.
- Povišenjem pH ekstrakcijskog otapala u rasponu od 3-11 količina detektiranih proteina naraste četverostruko.
- Cjelovito brašno ječma sadrži oko 4% malih peptida.
- pH pufera utječe na količinu ekstrahiranih slobodnih amino skupina.
- Glavnina slobodnih amino skupina (60-80%) određenih u ekstraktima brašna potiče od malih peptida i slobodnih aminokiselina.
- SDS-PAGE analiza ekstrakata pokazuje da proteini ekstrahirani Britton-Robinsonovim puferom različitog pH predstavljaju albumine i globuline ječma

6. LITERATURA

Australian Government: The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley), Version 1:2008. [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/barley-3/\\$FILE/biologybarley08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/barley-3/$FILE/biologybarley08.pdf) [24. 07. 2013.]

Bielikowicz K, Wojatacha P, Kostrya E, Iwan M, Jarmołowska and Kostyra H: Influence of glycation of wheat albumins and globulins on their immunoreactivity and physicochemical properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(4):335-340, 2010.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

Cavallero A, Empilli S, Brighenti F and Stanca AM: High(1→3,1→4)-b-glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. *Journal of Cereal Science*, 36: 59–66, 2002.

Huang W, Li L, Wang F, Wan J, Tilley M, Ren C and Wu S: Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough. *Food Chemistry*, 121: 934-939, 2010.

Kinsella JE: Functional properties of proteins in foods: A survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7:219–280, 1976.

Lásztity R: The chemistry of barley, in: R. Lásztity (Ed.), *Cereal Chemistry*, Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 168-191, 1999.

Lookhart G and Bean S: Separation and characterization of wheat protein fractions by high-performance capillary electrophoresis, *Cereal Chemistry*. 72:527-532, 1995.

Melzer J and Kleihofs A: Molecular genetics of barley endosperm proteins, *Barley Genetics Newsletter*, 17:13-24, 1987.

Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A and Tiedemann J: Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth, *Journal of Experimental Botany* 52:1741-1752, 2001.

Newman RK, Lewis SE, Newman CW, Boik RJ and Ramage RT: Hypocholesterolemic effect of barley foods on healthy men. *Nutritional Reports International*. 39:749–760, 1989.

Nielsen PM, Petersen D and Damnmann C: Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5):642-646, 2001.

Osborne TB: Proteins of barley, *Journal of the American Chemical Society*. 17:539, 1895.

Preston KR and Kruger JE: Mobilization of monocot protein reserves during germination, in: M. J. Dalling (Ed.), *Plant proteolytic enzymes*. Vol. 2, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 1-18, 1986.

Shewry PR: Barley seed proteins. In A. W. MacGregor, R. S. Bhatti (Eds.), *Barley: Chemistry and technology* (p. 131). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, USA, 1993.

Shewry PR and Halford NG: Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization, *Journal of Experimental Botany*. 53:947-958, 2002.

Strelec I: Metode izolacije i pročišćavanja proteina. U *Pisani materijali uz predavanja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Strelec I: *Praktikum iz biokemije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

Strelec I, Has-Schön E and Vitale Lj: Comparative electrophoretic patterns of albumins/globulins extracted from dry grains and green malts of barley varieties. *Poljoprivreda*, 18:36-43, 2012.

USDA, NRSC: The Plant Database, Version 3.5 (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4990, 2004.

Vojdani F: Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (pp. 11–60). London, UK: Chapman and Hall. 1996.

Yalçın E and Çelik S: Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 104:1641-1647, 2007.

Zayas JF: *Functionality of Proteins in Foods* (pp. 1-228). Springer-Verlag, Berlin, 1997.

<http://www.crc.dk/flab/the.htm> [14. 09. 2013.]